

14.01.00

日 本 国 特 許 庁 EU

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 03 MAR 2000

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 1月29日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第021077号

出 願 人

Applicant (s):

科学技術振興事業団

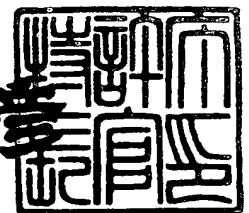
PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 2月18日



特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3007013

【書類名】 特許願

【整理番号】 A021P14

【提出日】 平成11年 1月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 5/00

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都豊島区南大塚 3-40-9

 【氏名】 浅島 誠

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市多摩区南生田 2-29-8 パナホーム
 サンライズ 201

 【氏名】 有泉 高史

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都目黒区駒場 1-28-7-203

 【氏名】 ▲せん▼ 徳川

【特許出願人】

 【識別番号】 396020800

 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

 【代表者】 中村 守孝

【代理人】

 【識別番号】 100107984

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 044347

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 インビトロで誘導した移植用臓器

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 インビトロで誘導した臓器を同種の被臓器移植動物の生体内に移植した際に生体内で機能することができる臓器の調製方法であって、被臓器移植動物の発生ステージに応じた所定の発生ステージまで該臓器を培養することを特徴とする移植用インビトロ誘導臓器。

【請求項 2】 被臓器移植動物の発生ステージに応じた所定の発生ステージが、被臓器移植動物と同じ発生ステージであることを特徴とする請求項 1 記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法。

【請求項 3】 所定の発生ステージを、インビトロで誘導した臓器の発生ステージに応じて発現するゲノム DNA を分子マーカーとして検定することを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法。

【請求項 4】 インビトロで誘導した臓器が、胞胚から切除した外胚葉域から誘導した臓器であることを特徴とする請求項 1～3 のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法。

【請求項 5】 インビトロでの誘導が、TGF（形質転換成長因子）- β ファミリーの存在下で行われることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法。

【請求項 6】 TGF（形質転換成長因子）- β ファミリーが、アクチビンであることを特徴とする請求項 5 記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法。

【請求項 7】 インビトロでの誘導が、アクチビン及びレチノイン酸の存在下で行われることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法。

【請求項 8】 臓器が、腎臓、心臓、脾臓、肝臓、腸管、脊索、骨格筋、白血球、赤血球、リンパ球から選ばれることを特徴とする請求項 1～7 のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法。

【請求項 9】 被臓器移植動物の生体が、胚であることを特徴とする請求項 1～8 のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法。

【請求項 10】 被臓器移植動物が、脊椎動物であることを特徴とする請求項 1～9 のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法。

【請求項 11】 請求項 1～10 のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法により調製することを特徴とするインビトロで誘導された移植用臓器。

【請求項 12】 インビトロで誘導した非ヒト動物の臓器を、同種の被臓器移植非ヒト動物の生体内に移植することを特徴とするインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法。

【請求項 13】 インビトロで誘導した非ヒト動物の臓器を、同種の被臓器移植非ヒト動物の発生ステージに応じた所定の発生ステージまで培養し、該培養後の臓器を被臓器移植動物の生体内に移植することを特徴とするインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法。

【請求項 14】 所定の発生ステージを、インビトロで誘導した臓器の発生ステージに応じて発現するゲノム DNA を分子マーカーとして検定することを特徴とする請求項 13 記載のインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法。

【請求項 15】 インビトロで誘導した臓器が、胞胚から切除した外胚葉域から誘導した臓器であることを特徴とする請求項 13 又は 14 のいずれか記載のインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法。

【請求項 16】 インビトロでの誘導が、TGF (形質転換成長因子) - β ファミリーの存在下で行われることを特徴とする請求項 13～15 のいずれか記載のインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法。

【請求項 17】 臓器が、腎臓、心臓、脾臓、肝臓、腸管、脊索、骨格筋、白血球、赤血球、リンパ球から選ばれることを特徴とする請求項 13～16 のいずれか記載のインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、発生工学又は臓器工学に関し、より詳しくは、生体内に移植した際に生体内で機能することができる、インビトロで誘導した移植用の腎臓、心臓、

脾臓、肝臓、腸管、脊索、骨格筋、白血球、赤血球、リンパ球等の臓器及びその調製方法や評価方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

すべての多細胞動物の発生は受精にはじまり、細胞分裂（卵割）と細胞分化を経て、多くの組織とバランスのとれた体制をもつ個体として完成されるが、このような分化のプロセスはきわめて複雑であり、誘導現象と呼ばれる重要な細胞間の相互作用が多段階にわたって行われていると考えられ、そして、もっとも重要なのは「形作りを支配する分子」の解明といわれており、またこのような研究の材料として、主に両生類胚がよく用いられるが、体づくりの基本的な法則はすべての脊椎動物に共通であり、相同な遺伝子は異なった生物種においてもきわめて類似した機能をもつことが知られている。

【0003】

従来より、両生類の胚は実験発生学においてきわめて重要な材料とされ、多くの研究がなされてきている。その理由は、体外で受精と発生をおこない、卵が大きいために胚手術が可能で、経時的変化を容易に観察できることにある。両生類の原腸胚の原口上唇部は特殊な領域であり、他の胚の腹側にこれを移植すると頭部もしくは胴尾部を含む二次胚が誘導され、このことから、原口上唇部は胚の体制を決定し形態形成の中心として働く領域として形成体(organizer)と名付けられており、形成体は原腸陥入のあいだに予定外胚葉へと働きかけて中枢神経を誘導し、それ自身は背側の中胚葉に分化することはよく知られている。

【0004】

また、実験動物として用いられるアフリカツメガエルの未受精卵は、動物極と植物極を結ぶ上下の軸をあらかじめ有するものの、背腹軸と左右軸は決定されおらず、受精すると、卵の表層と内側の細胞質の間に回転がおこり、その結果精子の侵入した側が将来の腹側、反対側が背側になることや、精子は必ず動物半球に侵入し、侵入点の180度反対側が将来の原口となることや、表層の回転は、受精卵の細胞質に含まれる体軸決定因子（デターミナント）の分布に偏りを生じさせ、このために背腹軸が成立することが知られている。図1に、アフリカツメ

ガエルの発生過程を模式的に示す。

【0005】

図1からもわかるように、中胚葉誘導は、卵割が進行して胚が桑実胚期に達するころに開始される最初の誘導であり、これは植物半球の割球が動物半球の割球に働きかけて帯域に中胚葉を誘導する現象として実験的にその存在が証明されている。このとき植物半球割球は背腹軸に沿った誘導の勾配をもち、腹側の割球は腹側中胚葉を、背側の割球は形成体を含む背側中胚葉を誘導する、すなわち、中胚葉誘導は中胚葉の部域化を行い、形成体の領域を特定することが知られている。そして、この中胚葉誘導は両生類に特有な現象ではなく、すべての脊椎動物の初期胚で中胚葉と形成体の形成にかかわっていると考えられている。

【0006】

また、誘導現象においては何らかの化学物質が細胞間で輸送されていると考えられているが、中胚葉誘導では植物半球の細胞から動物半球側に分泌されるものが中胚葉誘導因子と呼ばれ、この胚に存在する中胚葉誘導因子の固定は、発生学研究のもっとも重要なテーマの一つであり、両生類の胚では、古くからさまざまな胚手術が行われており、誘導因子のアッセイ系も確立されている。例えば、中胚葉誘導因子の活性を直接的に調べる方法としてアニマルキャップアッセイが、主に候補となる因子やレセプター分子などのmRNAを2細胞期から8細胞期の受精卵に注入して正常発生への影響を調べる方法としてインジェクションアッセイが、それぞれ知られている。そして本発明者らは、かかるアニマルキャップアッセイを用いて、TGF- β ファミリーの細胞成長因子アクチビンに中胚葉誘導活性があることを最初に報告した (Roux' Arch. Dev. Biol. 198: 330-335, 1990)。

【0007】

一方、脊椎動物の発生過程では、前腎、中腎、後腎という3つの腎臓が順に作られ、それらが排出器官として機能し、これらの腎臓は中間中胚葉に由来し、時間的にも空間的にも整然と形づくられ、特に前腎は最初に作られる非常に単純な構造をもった排出器官であり、腎臓の基本単位であるネフロン数は3種類で異なるが、その細胞学的な性質は共通であり、したがって、前腎は腎臓形成の仕組

みを研究する上でとても有用なモデル系として知られている。本発明者らは、前腎（前腎細管）を誘導する比較的簡単な実験系を確立し、ツメガエルの胞胚期の外胚葉片をアクチビンとレチノイン酸で処理すると前腎細管が誘導され、この前腎細管はオタマジャクシの前腎に発現するいくつかの分子マーカーを発現することを確認している。しかし、この前腎（前腎細管）が生体に移植した際に臓器として機能することができかどうかについては知られていなかった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

これまでに両生類胚の腎臓、すなわち前腎をインビトロで誘導する実験系の確立が世界中で試みられ、前腎だけを特異的に誘導することは不可能とされていたが、上記のように、本発明者らはツメガエルの胞胚の外胚葉片を生理活性物質であるアクチビンとレチノイン酸で処理し、前腎のみを分化させる実験系を確立した。しかし、このインビトロで誘導した前腎は、生体に移植され実際に排出器官として機能することが確認されて初めて移植用臓器として認められることになる。

【0009】

本発明の課題は、インビトロで誘導した臓器が実際に生体内でも機能するかどうかを評価するために、発生工学あるいは臓器工学を利用し、臓器のインビトロでの誘導と生体移植の手法を確立し、より高等な動物の先天性腎疾患等の移植治療への道を拓く移植用臓器を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、アフリカツメガエルの胚の外胚葉片（多分化能を備えた細胞集団）をアクチビンとレチノイン酸で処理し、個体発生で最初に作られる最も基本的な排出器官である前腎の分化誘導を行い、続いて前腎へ分化の方向性が決まった外胚葉片を、あらかじめ前腎原基（本来、前腎を形成する領域）を除去した胚に、該前腎原基の発生ステージに応じた所定の発生ステージまで培養した後移植すると、インビトロで作った前腎が生体内で機能することを世界で初めて見出し、インビトロで作った臓器を生体に移植することができることを確認し、本発

明を完成するに至った。

【0011】

すなわち本発明は、インビトロで誘導した臓器を同種の被臓器移植動物の生体内に移植した際に生体内で機能することができる臓器の調製方法であって、被臓器移植動物の発生ステージに応じた所定の発生ステージまで該臓器を培養することを特徴とする移植用インビトロ誘導臓器の調製方法（請求項1）や、被臓器移植動物の発生ステージに応じた所定の発生ステージが、被臓器移植動物と同じ発生ステージであることを特徴とする請求項1記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法（請求項2）や、所定の発生ステージを、インビトロで誘導した臓器の発生ステージに応じて発現するゲノムDNAを分子マーカーとして検定することを特徴とする請求項1又は2記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法（請求項3）や、インビトロで誘導した臓器が、胞胚から切除した外胚葉域から誘導した臓器であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法（請求項4）や、インビトロでの誘導が、TGF（形質転換成長因子）- β ファミリーの存在下で行われることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法（請求項5）や、TGF（形質転換成長因子）- β ファミリーが、アクチビンであることを特徴とする請求項5記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法（請求項6）や、インビトロでの誘導が、アクチビン及びレチノイン酸の存在下で行われることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法（請求項7）や、臓器が、腎臓、心臓、脾臓、肝臓、腸管、脊索、骨格筋、白血球、赤血球、リンパ球から選ばれることを特徴とする請求項1～7のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法（請求項8）や、被臓器移植動物の生体が、胚であることを特徴とする請求項1～8のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法（請求項9）や、被臓器移植動物が、脊椎動物であることを特徴とする請求項1～9のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法（請求項10）に関する。

【0012】

また本発明は、上記請求項1～10のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓

器の調製方法により調製することを特徴とするインビトロで誘導された移植用臓器（請求項 11）や、インビトロで誘導した非ヒト動物の臓器を、同種の被臓器移植非ヒト動物の生体内に移植することを特徴とするインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法（請求項 12）や、インビトロで誘導した非ヒト動物の臓器を、同種の被臓器移植非ヒト動物の発生ステージに応じた所定の発生ステージまで培養し、該培養後の臓器を被臓器移植動物の生体内に移植することを特徴とするインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法（請求項 13）や、所定の発生ステージを、インビトロで誘導した臓器の発生ステージに応じて発現するゲノム DNA を分子マーカーとして検定することを特徴とする請求項 13 記載のインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法（請求項 14）や、インビトロで誘導した臓器が、胞胚から切除した外胚葉域から誘導した臓器であることを特徴とする請求項 13 又は 14 のいずれか記載のインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法（請求項 15）や、インビトロでの誘導が、TGF（形質転換成長因子）- β ファミリーの存在下で行われることを特徴とする請求項 13 ～ 15 のいずれか記載のインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法（請求項 16）や、臓器が、腎臓、心臓、脾臓、肝臓、腸管、脊索、骨格筋、白血球、赤血球、リンパ球から選ばれることを特徴とする請求項 13 ～ 16 のいずれか記載のインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法（請求項 17）に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法は、インビトロで誘導した臓器を同種の被臓器移植動物の生体内に移植した際に生体内で機能することができる臓器の調製方法であって、被臓器移植動物の発生ステージに応じた所定の発生ステージまで該臓器を培養することを特徴とする。

【0014】

本発明におけるインビトロで誘導される臓器には、腎臓、心臓、脾臓、肝臓、腸管等動物の内臓等を構成する器官の他に、便宜上、脊索、骨格筋、白血球、赤血球、リンパ球などの組織が含まれる。また、本発明における被臓器移植動物と

しては、インビトロで誘導される臓器と同種、すなわち分類学上同じ“種(species)”の脊椎動物、例えばイモリやカエル等の両生類、魚類、鳥類、マウス等の哺乳動物などの非ヒト動物の他に、ヒトも含まれる。

【0015】

臓器のインビトロでの誘導は、胞胚から切除した外胚葉域（アニマルキャップ）を用いることが望ましい。胞胚の予定外胚葉領域は未分化の細胞群であるため、培養液に含まれる物質に中胚葉誘導活性がない場合は組織を分化することなく、表皮様細胞の塊（不整形表皮）となるが、培養液中に中胚葉誘導活性が存在すると内部に血球、筋肉、脊索などの中胚葉を含む組織塊となる。細胞分化及び発生ステージの検定には、組織の観察と同時に多くの遺伝子マーカーや抗体を用いた定量的解析を行うことが好ましい。

【0016】

インビトロで誘導した臓器を同種の被臓器移植動物の生体内に移植した際に生体内で機能することができるかどうかは移植時期に大きく依存することから、インビトロで誘導した移植用臓器は、同種の被臓器移植動物の発生ステージに依じた所定の発生ステージ、すなわち生体内に移植した際に生体内で機能することができる発生ステージまで培養する必要がある。そして、多くの場合、被臓器移植動物と同じ発生ステージまで培養し、該培養後の臓器を被臓器移植動物の生体内に移植すると、生体内に移植した際に生体内で機能する可能性が大きくなる。例えば、被臓器移植動物の移植対象となる臓器が原基（primordium）である発生ステージのときは、移植用臓器も同じ発生ステージの原基まで生理食塩水等を用いて培養することが、また移植対象となる臓器が完全な器官である発生ステージのときは、移植用臓器も同じ発生ステージの完全な器官まで血清等を用いて培養することが好ましい。ここで、発生ステージとは、受精卵又は単為発生卵などを出発点として一つの生物が成体に到達する個体発生の進行を、一定の段階（ステージ）に区切って番号をつけた各段階（ステージ）をいい、例えば両生類では変態に至るまでが約60期の発生ステージに分けられている。

【0017】

かかるインビトロ誘導臓器の発生ステージの検定は、上記のように組織の観察

や抗体を用いる方法によっても行うことができるが、インビトロで誘導した臓器の発生ステージに応じて発現するゲノムDNAを分子マーカーとすることにより一層精確な検定を実施することができる。例えば、両生類胚の正常発生においては、卵割が12回行われた中期胞胚期からゲノムDNAの発現が急激に増加し、その後は胚の発生ステージに応じて発現する遺伝子の量と種類が厳密な階層を示しながら変化していくことが明らかになっているが、アクチビンにより処理されたインビトロ誘導臓器においても、表1に示すようにこの階層は完全に再現されている。また特に、アフリカツメガエルの腎臓分化に関連するマーカー遺伝子としては、発生ステージ第11期～第31期に発現するXlim-1、発生ステージ第20期以降に発現するXpax-2、発生ステージ第22期以降に発現するXCIRPやXeWT1、発生ステージ第27期以降に発現するNa⁺K⁺-ATPase、発生ステージ第31期以降に発現するCap-1やXlcaax-1を例示することができる。

【0018】

【表1】

遺伝子名	発現開始時間	特 徴
初期応答遺伝子		
Mix.1	約30分	ホメオボックス遺伝子、ショウジョウバエのpairedに類似
goosecoid	約30分	ホメオボックス遺伝子、ショウジョウバエのgooseberryとbicoidに類似
Xlim-1	約2時間	LIMドメインを持つホメオボックス遺伝子
Xbra	90-250分	マウスのBrachyury (T)に類似
後期応答遺伝子		
XHbox 1	約11時間	ホメオボックス遺伝子、ショウジョウバエのantennapediaに類似
XHbox 6	約13時間	ホメオボックス遺伝子、ショウジョウバエのabdominal-Bに類似
Xwnt-8	約16時間	癌遺伝子 Wnt-1(int-1)に類似
XMyoD	約16時間	マウスのMyoDに類似
a-actin	約19時間	心筋と骨格のアクチン遺伝子
N-CAM	約19時間	神経細胞接着分子の遺伝子

【0019】

本発明におけるインビトロでの臓器の誘導は、TGF- β ファミリーの存在下で行うことができる。TGFは形質転換成長因子あるいはトランスフォーミング増殖因子とも呼ばれ、培養環境に添加したとき単独又は他の因子との共同で、細胞の正常な増殖特性をトランスフォーム様の増殖特性に転換させる作用を有し、

かかるTGFには、上皮増殖因子(EGF)と受容体を共通するTGF- α と、TGF- α と共同してTGF活性を示すTGF- β がある。そして、TGF- β ファミリーとしては、TGF- β 、アクチビン、インヒビン、ミューラー管抑制因子などを挙げるができるが、中胚葉誘導活性の点でアクチビンが特に好ましい。

【0020】

卵巣の顆粒膜細胞などから分泌され、脳下垂体前葉からの卵胞刺激ホルモン(FSH)の分泌を促進させる活性をもつ細胞増殖因子であり、FSH分泌抑制因子作用をもつインヒビン β 鎖のサブユニットがS-S結合したダイマーとして存在している哺乳類のアクチビンは、0.1 ng/ml以上の濃度で予定外胚葉片に中胚葉組織を誘導し、筋アクチンやホメオボックス遺伝子などの中胚葉マーカー遺伝子の発現をひきおこすことができ、いずれのアッセイ系においても腹側から背側にいたるすべての中胚葉組織を誘導できる特徴を有するが、アクチビンの作用は明確に濃度依存的であり、濃度が高くなるに従ってより背側の中胚葉を分化し、およそ0.3~1.0 ng/mlの濃度で処理されたアニマルキャップの内部には血球、体腔上皮、間充織が、5~10 ng/mlの濃度では筋肉が、50~100 ng/mlにおいては最も背側の中胚葉である脊索がそれぞれ分化してくる。

【0021】

他方、FGF(繊維芽細胞増殖因子)も濃度に応じて血球、間充織、筋肉を分化させるが、高濃度(30~120 ng/ml)でも脊索は誘導できないことから、インビトロでの臓器の誘導は、アクチビン等のTGF- β ファミリーの存在下で行うことが望ましい。また、アクチビン処理した外植体の内部にはしばしば神経組織が観察されるが、これは高濃度のアクチビンによって誘導された形成体が、未分化の細胞に神経誘導をおこなうことで生じると考えられ、これらのことは、アクチビンが単に組織の分化を誘導するのみならず、背腹軸の決定に密接に関わっていることを示している。アクチビンによるアニマルキャップへの器官形成の誘導を図2に示す。

【0022】

さらに、アクチピンはいくつかの他種の生体内物質との相互作用によってさまざまな器官を誘導することができる（図2参照）。本発明者らによると、ツメガエルのアニマルキャップを適当な濃度のアクチピンとレチノイン酸で処理することによって腎臓の分化を、またアクチピンとBMP（骨形成因子）、もしくはIL-11、SCF(Stem Cell Factor)によって血球の分化をコントロールすることができる。上記図2においてRAで示されるレチノイン酸は、ビタミンA酸とも呼ばれ、ビタミンA（レチノール）の重要な代謝産物であり、動物の正常な発育、上皮組織や軟骨の分化増殖に必須とされ、脊椎動物の発生過程においてモルフォゲン様作用をもち、レチノイン酸受容体を介して遺伝子の発現を制御することによってその作用を発揮する。

【0023】

以下に、実施例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1

インビトロにおけるアクチピン及び／又はレチノイン酸による外植体の分化パターンについて調べた。アフリカツメガエルの胞胚（発生ステージ第9期）から外胚葉域を切り出し、 10 ng/ml のアクチピン（ヒト組換えアクチピンA）溶液、 10^{-4}M のレチノイン酸（米国シグマ社製「R-2625」）溶液、及びアクチピン 10 ng/ml とレチノイン酸 10^{-4}M を含む混合溶液で3時間処理し、生理食塩水（スタインバーグ溶液）中で4日間培養し、インビトロにおける外植体の分化誘導パターンを調べた。結果を表2に示す。なお、表2中の括弧内の数値は全試料数に対する割合（％）を示す（表3も同じ）。表2から、アクチピン 10 ng/ml とレチノイン酸 10^{-4}M を含む混合溶液で処理したものは、4日目に前腎細管が高頻度で分化し、処理した外胚葉片のうち86％のものが前腎細管を形成した。図3に形成された前腎細管（矢印部分）を模式的に示す（参考写真1参照）。また、アクチピン単独処理の場合は、外胚葉片に筋肉や間充織、体腔上皮、神経組織などが誘導され、無処理及びレチノイン酸単独処理の場合は、何も分化が見られず、外胚葉片は不整形な表皮細胞塊となることがわかる。

【0024】

実施例 2

インビボ（生体内）におけるアクチビン及び／又はレチノイン酸による外植体（移植片）の分化パターンについては移植法によって調べた。実施例 1 と同様に調製した外植体（0.3 mm×0.3 mm）をアフリカツメガエルの胚（発生段階第 20 期）左側の前腎原基除去（切除）部分に移植し、5 日後にインビボにおける外植体の分化誘導パターンを調べた。結果を実施例 1 と同様に表 2 に示す。表 2 から、アクチビン 10 ng/ml とレチノイン酸 10^{-4} M を含む混合溶液で処理したものは、4 日目に前腎細管が高頻度で分化し、処理した外胚葉片のうちすべてのものが宿主胚の内部で前腎細管を形成し、アクチビン単独処理の場合は、外胚葉片に筋肉や体腔上皮、表皮などが誘導され、前腎細管に分化したものはごく僅かであり、無処理及びレチノイン酸単独処理の場合は、ほとんど分化が見られず、外胚葉片は宿主胚の表皮の一部を形成することがわかる。なお、前腎細管に分化することは、1%フルオレセイン-デキストラン-アミンからなる蛍光色素（FDA 製分子プローブ「D-1820」）によって移植片をラベルし、それを追跡することにより確認した。

【0025】

【表 2】

アクチビン A 濃度 (ng/ml) レチノイン酸濃度 (M)	インビトロ				インビボ			
	0	10^{-4}	0	10^{-4}	0	10^{-4}	0	10^{-4}
試料数	37	32	35	37	14	15	23	23
不整形表皮	37 (100)	32 (100)	0	1 (3)	14 (100)	15 (100)	0	0
表皮	0	0	34 (97)	35 (95)	0	0	6 (26)	8 (35)
神経組織	0	0	28 (80)	2 (5)	0	0	1 (4)	0
筋肉	0	0	32 (91)	2 (5)	0	0	16 (70)	0
前腎細管	0	0	0	32 (86)	0	0	4 (17)	23 (100)
間充織	0	0	27 (77)	7 (19)	0	0	0	0
体腔上皮	0	0	3 (86)	7 (19)	0	0	10 (43)	8 (35)
腸	0	0	0	0	1 (7)	1 (7)	8 (35)	4 (17)

【0026】

実施例 3

実施例 1 記載の方法により、インビトロでアクチビンとレチノイン酸の混合溶液を用いて分化誘導した、発生ステージ第 20 期に応じて発現するゲノム DNA である XPax-2 を分子マーカーとして検出した発生ステージ第 20 期と検定された

前腎細管に分化する外胚葉片を、発生ステージ第20期、第23期及び第25期の段階で、あらかじめ左右の前腎原基（第3～第5体節の下方に存在）を摘出除去したアフリカツメガエルの胚の除去部位片側に移植し、生体内で機能することができるかどうかを調べた。移植の概要を図4に示す。なお、対照として、移植することなく左右の前腎原基を摘出除去したアフリカツメガエルを用いた。結果を表3に示す。

【0027】

【表3】

ステージ	20		23		25	
	対照	移植	対照	移植	対照	移植
試料数	96	141	36	48	10	19
正常胚	7(7)	29(21)	1(3)	4(8)	0	1(5)
水腫胚	89(93)	112(79)	35(97)	44(92)	10(100)	18(95)

【0028】

表3から、発生ステージ第20期に移植した場合には141例のうち29例（21%）が、発生ステージ第23期に移植した場合には48例のうち4例（8%）が、発生ステージ第25期に移植した場合には19例のうち1例（5%）が、水腫を形成せずに正常に発生し、移植された前腎が排出器官として機能し、水腫の形成を抑えたのに対し、対照である左右の前腎原基を摘出除去された胚は、発生ステージ第20期では96例のうち7例（7%）が、発生ステージ第23期では36例のうち1例（3%）が水腫を形成せずに正常に発生したにすぎず、発生ステージ第25期では10例のうちすべてが水分排出できずに水腫を形成していた。図5（A）に水腫を形成したオタマジャクシと、図5（B）に正常に発生したオタマジャクシ（矢印が移植後、前腎細管を形成した外胚葉片）を模式的に示す（参考写真2参照）。

【0029】

また、発生ステージ第20期における移植又は摘出除去の術後の経過日数と生存率との関係を図6に示す。図6より、移植することなく摘出除去した場合には、水腫を形成して9日以内に死亡するが、移植した場合には、上記のように14

1例のうち29例(21%)が水腫を形成せずに正常に発生し、そのうち数例が一ヶ月以上生存することがわかる。

【0030】

アカガエル科のラナ・ダルマティナ (*Rana dalmatina*) を用いた実験でも知られているように、初期胚から左右の前腎原基を除去すると、除去胚は水分排出ができずに水腫(edema)を形成する。上記実施例3の移植試験において、発生ステージ第20期～第25期までの胚の第3～第5体節の下部にある前腎原基を摘出除去した胚に、アクチビン/レイノイン酸処理した発生ステージ第20期～第25期の外胚葉片を移植し、水腫形成が抑えられるという結果が得られたことから、移植片が前腎すなわち排出器官として機能したと判断できる。発生ステージ第20期に移植されたものに比べて、発生ステージ第23期以降に移植手術を行った場合には、正常に発生したものは著しく少なく、このことは、移植を行う時期が非常に重要な要素であり、後期のステージ(ステージ25)を用いると、宿主に対する移植用臓器の適応性が著しく低下することがわかった。

【0031】

【発明の効果】

本発明によると、アクチビンあるいはアクチビンとレイノイン酸等を中胚葉誘導因子として用いた比較的簡単な実験系で臓器をインビトロで誘導することができ、このインビトロ誘導臓器を被臓器移植動物の発生ステージに応じた所定の発生ステージまで培養することにより、同種の被臓器移植動物の生体内に移植した際に生体内で機能することができる臓器を調製することができ、また、インビトロで誘導した臓器を、同種の被臓器移植動物の発生ステージに応じた所定の発生ステージまで培養した後生体内に移植することにより、インビトロで誘導した臓器が移植用臓器として適しているかどうかを評価することができる。

【0032】

また、本発明によると、インビトロで誘導された臓器が実際に生体内で機能することを確認することができるので、腎臓等の臓器の形成の仕組みを解明する上で多くの有用な知見を得ることができるばかりでなく、インビトロでの臓器形成とその生体への移植という発生工学あるいは臓器工学の新たな分野の確立にも貢

献することができる。さらに、本発明によると、免疫的に適合した臓器の移植が可能となり、ヒトを含めた高等動物の腎疾患等の各種疾病に対して治療の道を拓くことができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

アフリカツメガエルの発生過程を模式的に説明する図である。

【図 2】

中胚葉誘導因子であるアクチビン及び他の生理活性物質によって誘導を受けたアニマルキャップの器官形成を説明する図である。

【図 3】

アクチビンとレチノイン酸の混合溶液で処理された外胚葉片に形成された前腎細管を模式的に示す図である。

【図 4】

前腎細管に分化する外胚葉片を、あらかじめ左右の前腎原基を摘出除去したアフリカツメガエルの胚の除去部位片側に移植する概要を示す図である。

【図 5】

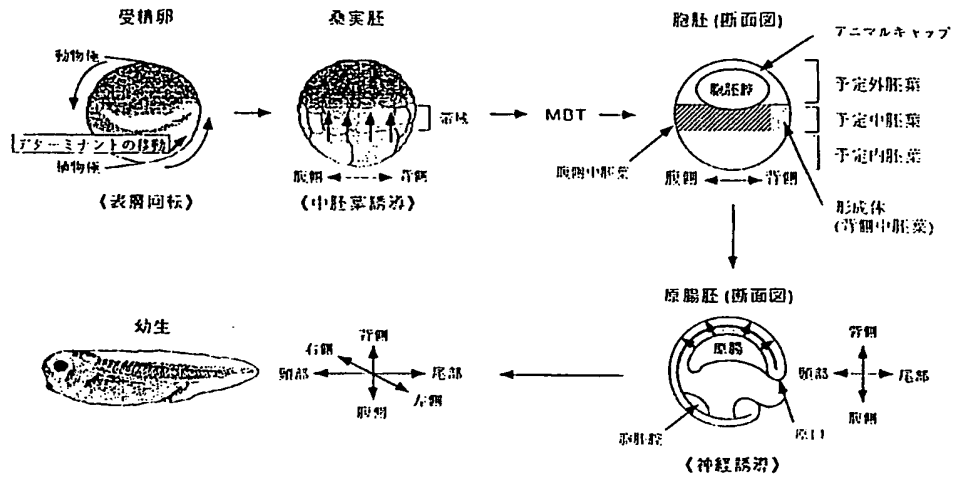
前腎原基が摘出除去され水腫を形成したアフリカツメガエルのオタマジャクシ（A）と、前腎細管に分化した移植片を片側にもつアフリカツメガエルのオタマジャクシ（B）を模式的に示す図である。

【図 6】

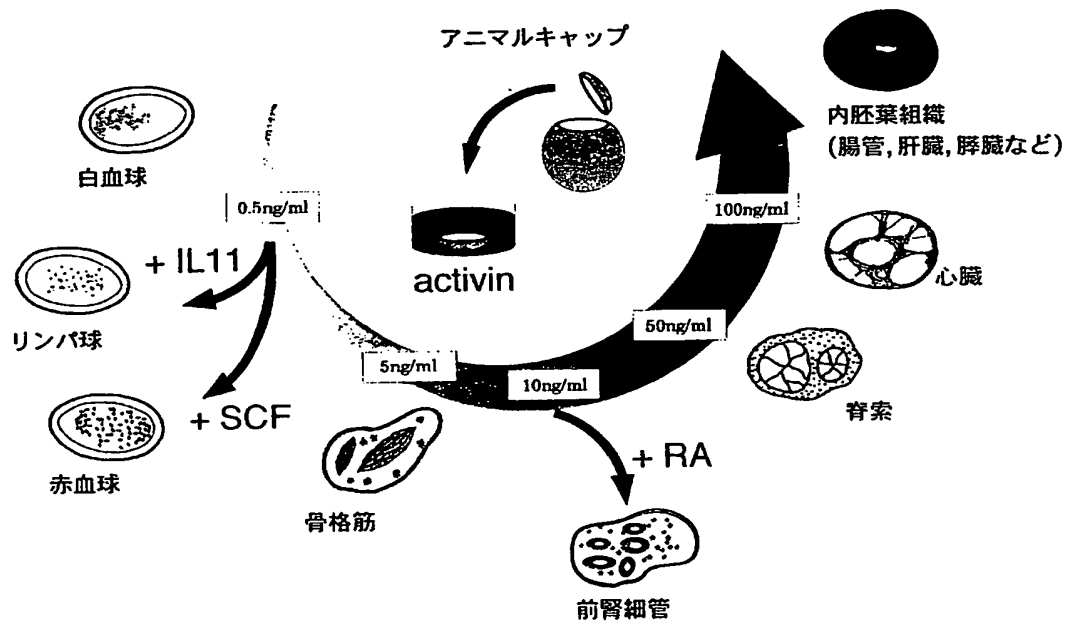
アフリカツメガエル発生ステージ第 20 期における前腎細管へ誘導された移植片をもつ移植体と移植を受けなかった前腎原基摘出除去体との術後の生存カーブを示す図である。

【書類名】 図面

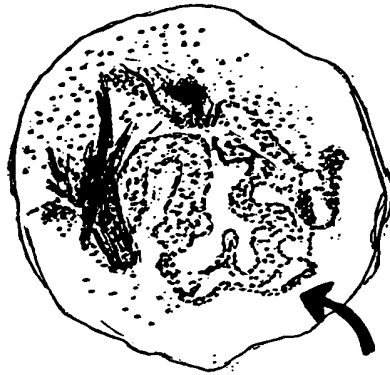
【図 1】



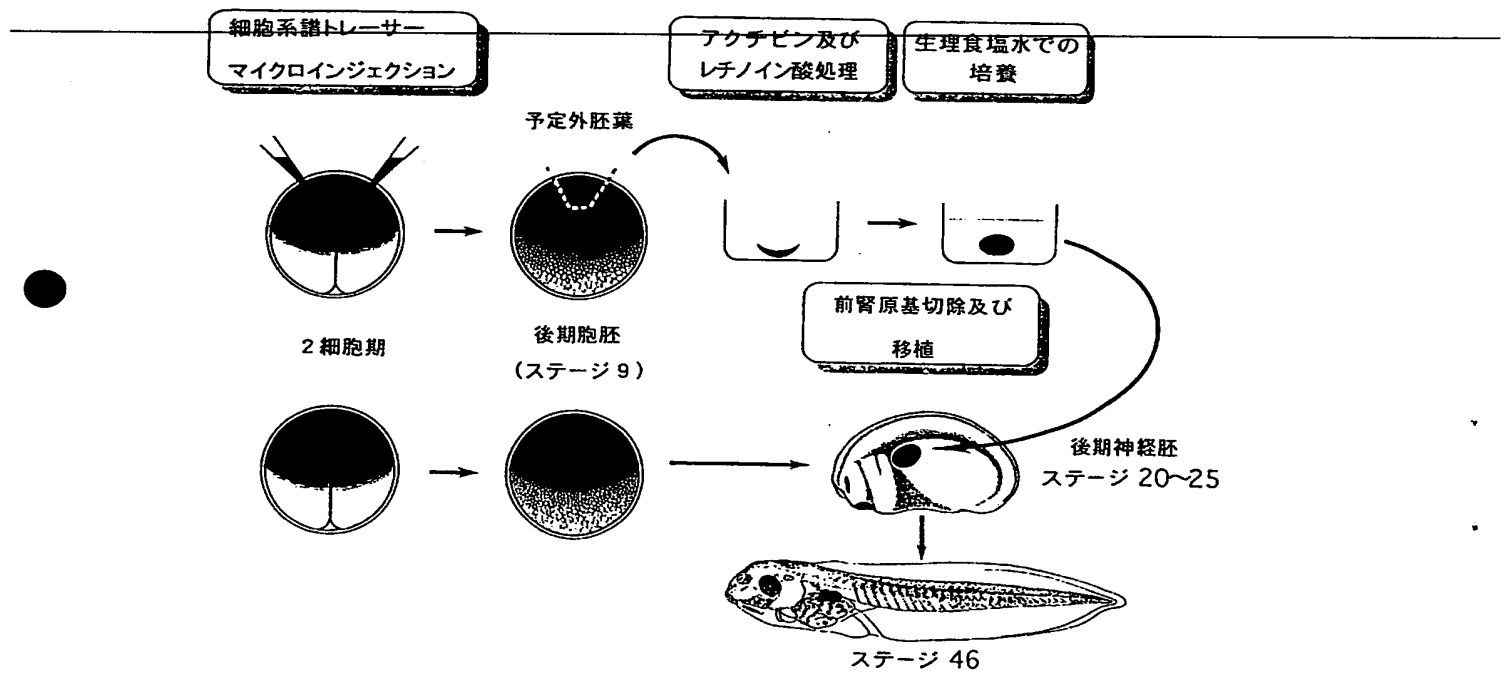
【図 2】



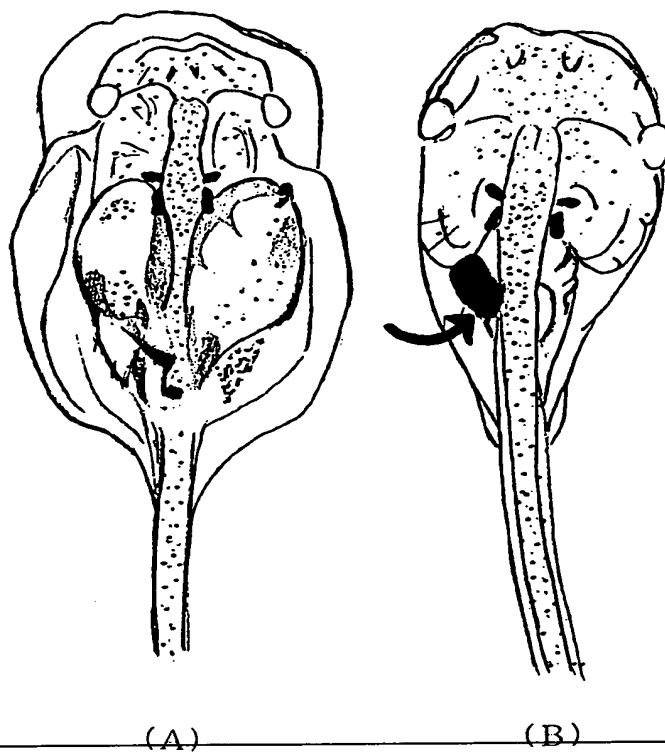
【図 3】



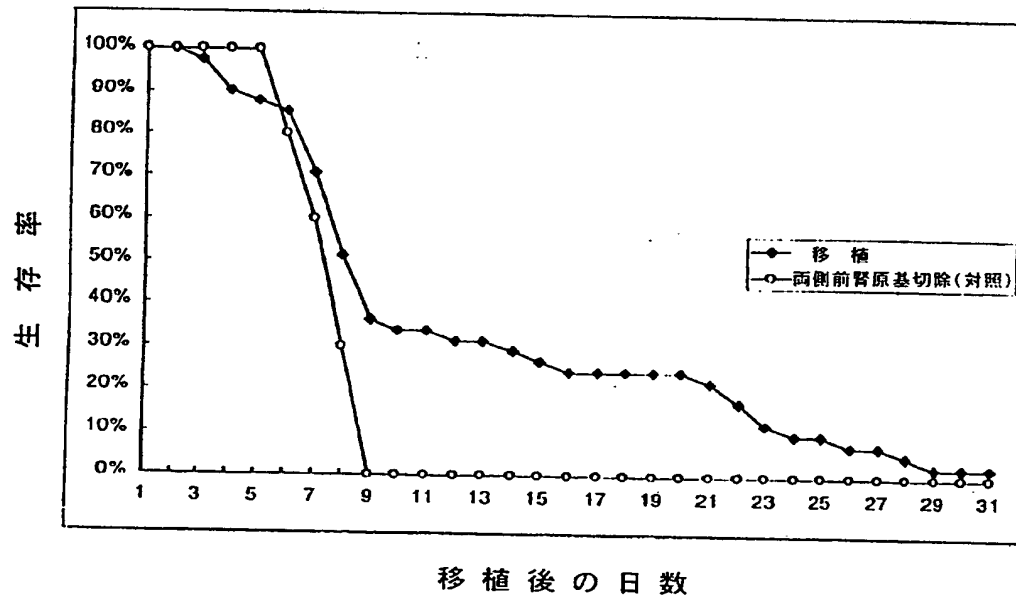
【図 4】



【図5】



【図6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 インビトロで誘導した臓器が実際に生体内でも機能するかどうかを評価するために、発生工学あるいは臓器工学を利用し、臓器のインビトロでの誘導と生体移植の手法を確立し、より高等な動物の先天性腎疾患等の移植治療への道を拓く移植用臓器を提供すること。

【解決手段】 アクチビン等のTGF- β ファミリーの存在下、インビトロで誘導した腎臓、心臓、脾臓、肝臓、腸管等の臓器を、同種の被臓器移植動物の発生ステージに応じた所定の発生ステージまで該臓器を培養し、生体内に移植した際に生体内で機能することができる移植用臓器を調製する。発生ステージは、インビトロで誘導した臓器の発生ステージに応じて発現するゲノムDNAを分子マーカーとして検定することができる。

【選択図】 図6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団